

研究报告

从海水环境分离筛选甘蔗渣纤维素降解菌

王贤丰¹ 单洪伟¹ 张家松² 马甦^{1*} 李色东³

(1. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 山东 青岛 266003)

(2. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广东 广州 510300)

(3. 湛江恒兴南方海洋科技有限公司 广东 湛江 524000)

摘要:【目的】筛选海水环境高效甘蔗渣纤维素降解菌,并研究不同菌株间的混合发酵对甘蔗渣纤维素酶活力的影响,为纤维素降解菌在海水养殖中的应用提供理论基础。【方法】采用刚果红染色法进行菌株初筛,利用DNS法测定各菌株胞外纤维素酶活力及不同菌株间的混合酶液与混合发酵酶液的纤维素酶活力。【结果】筛选得到两株具有较强纤维素分解能力的细菌菌株Z4和S5,经16S rRNA基因序列分析,初步鉴定为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。菌株S5具有最高的全酶活和甘蔗渣纤维素酶活,分别为1.16 U/mL和2.80 U/mL。菌株Z4与S5间混合发酵能明显提高菌株的纤维素酶活力,比S5单独发酵时全酶活、甘蔗渣纤维素酶活分别提高40.60%、14.21%。同时菌株S5与芽孢杆菌BZ5混合发酵也能提高其纤维素酶活力,比S5单独发酵时全酶活、甘蔗渣纤维素酶活分别提高6.23%、25.92%。【结论】筛选得到两株酶系较全且酶活较高的纤维素降解菌Z4、S5,适宜的混合发酵可明显提高纤维素降解能力,在海水养殖中有较大的应用前景。

关键词: 纤维素降解菌, 海水环境, 甘蔗渣, 筛选

Isolation and screening of bagasse-cellulose degrading-bacteria from seawater environment

WANG Xian-Feng¹ SHAN Hong-Wei¹ ZHANG Jia-Song² MA Shen^{1*}
LI Se-Dong³

(1. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

(2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong 510300, China)

(3. Zhanjiang Evergreen South Marine Science and Technology Co. Limited, Zhanjiang, Guangdong 524000, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study was to screen bagasse-cellulose degrading-bacteria from seawater environment and to research the influence on bagasse cellulose enzymatic activity by mixed-fermentation of strains. [Methods] Cellulose congo-red culture medium was used to screening, and extracellular enzyme activity as re-screening methods. [Results] Two strains (Z4 and S5) were isolated and identified as *Bacillus licheniformis* by 16S rRNA gene sequence similarity analysis. Strain

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2011BAD13B10); 公益性行业(农业)科研专项项目(No. 201103034)

*通讯作者: Tel: 86-532-82032041; 邮箱: mashen@ouc.edu.cn

收稿日期: 2014-09-04; 接受日期: 2014-11-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-12-15

S5 possessed the highest filter paper activity (FPA activity) and bagasse cellulose activity which were 1.16 U/mL and 2.80 U/mL respectively. Mixed-fermentation of Z4 and S5 could obviously increase in cellulose enzyme activity. FPA activity and bagasse cellulose activity increased by 40.60% and 14.21% compared to S5. Mixed-fermentation of S5 and *Bacillus* BZ5 increased FPA activity and bagasse cellulose activity by 6.23% and 25.92% respectively. **[Conclusion]** Mixed-fermentation can significantly improve the ability of cellulose degradation, Z-4 and S-5 have a potential application in mariculture.

Keywords: Cellulose degrading-bacteria, Seawater environment, Bagasse-cellulose, Screening

在水产养殖生产中, 养殖生物量的增加及高蛋白饵料的大量投喂会使氨氮(TAN)和亚硝氮($\text{NO}_2\text{-N}$)等有毒无机氮化合物迅速积累, 这是养殖水体恶化、病害频发的重要原因之一^[1]。目前普遍通过大量换水来改善养殖水质, 而这不仅浪费资源, 也会对周围环境产生污染, 同时增加养殖风险^[2]。向养殖系统中添加碳源能有效降低水体中 Toxic 无机氮化合物含量^[3], 并在增加养殖产量及提高饲料利用率方面具有积极作用^[4-5]。然而, 微生物可直接利用的碳源如蔗糖、糖蜜、木薯粉等由于成本太高并不适合向养殖系统中长期投放, 因此实际生产中亟需一种廉价可替代碳源添加途径。甘蔗渣是制糖工业的副产物, 具有产量巨大、来源集中、容易获取、价格低廉等特点, 由于其含有大量的纤维素类物质, 因此在养殖生产中碳源添加方面具有广阔的应用空间。

在自然环境中, 纤维素类物质形态稳定降解缓慢, 目前对其利用很不充分, 除小部分用于堆肥、畜禽饲料外, 大部分作为燃料直接燃烧, 不仅造成资源浪费, 同时也会污染环境^[6]。国内外学者普遍通过筛选环境中具有纤维素利用能力的微生物, 并利用诱变、重组等生物工程技术提高其纤维素利用能力, 进而有效利用纤维素资源。虽然对纤维素功能微生物做了大量的研究, 但是所得到的菌株仍然存在产酶量少、酶活力低、生产成本高等问题, 同时现有研究主要集中在陆源纤维素功能菌的筛选, 对于海洋环境, 特别是海水养殖环境中的纤维素降解菌鲜有文献报道^[7]。

甘蔗渣在水产养殖中的应用已有许多报道, 具有改良底质^[8]、吸附重金属离子^[9]、减少病害及降

低饵料系数^[10]等作用。但是在养殖系统中, 由于甘蔗渣主要成分为木质纤维素, 其形态稳定不易作为碳源被微生物利用, 然而可以通过纤维素降解菌的分解作用将甘蔗渣纤维素降解为单糖或双糖等微生物可直接利用的碳源, 从而增加养殖水体中的可利用碳源含量, 提升养殖效果^[11]。本研究的主要目的是筛选在海水养殖环境中具有高效降解能力的纤维素降解菌, 并通过混合发酵方式探究纤维素降解菌对甘蔗渣纤维素的高效降解方法, 为纤维素降解菌与甘蔗渣在海水养殖中的应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 实验菌株分离筛选自广东省湛江恒兴南方海洋科技有限公司盐度为 22–32 海水对虾养殖池外排水水体及甘蔗渣附着基。芽孢杆菌 BZ5 筛选自浙江舟山对虾温棚集约化养殖池塘和高位池集约化养殖池塘, 为中国海洋大学养殖技术实验室保存菌株, 具有高效氨氮降解能力^[12]。

1.1.2 主要试剂和仪器: 刚果红、葡萄糖、DNS 试剂、磷酸缓冲液 (pH 6.8)、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、Whatman No.1 滤纸, 购自杭州沃华滤纸有限公司; 水杨酸, 购自国药集团化学试剂有限公司; 甘蔗渣纤维素: 将甘蔗渣粉碎过 60 目, 用 2% 的 NaOH 溶液浸泡甘蔗渣粉 1 h (85 °C), 冷却后水洗至中性, 烘干备用。

超声波清洗器, 购自昆山超声仪器有限公司; 漩涡振荡器, 购自上海思伯明仪器设备有限公司; 可见光分光光度计, 购自尤尼柯(上海)有限公司; 高速低温离心机, 购自北京时代北利离心机有限公

司; PCR 仪、电泳仪、紫外凝胶成像系统, 购自 Bio-Rad Laboratories Inc.。

1.1.3 培养基(盐度 30): 羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 培养基(g/L): CMC-Na 10.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KH_2PO_4 1.0, Na_2HPO_4 1.0, 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, NaCl 30.0, 蒸馏水 1 L, pH 值 7.2–7.4; 固体培养基加 20 g 琼脂。经 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后使用。

1.2 纤维素降解菌的分离

1.2.1 蔗渣附着菌: 称取 1.0 g 湿重甘蔗渣样品于 15 mL 无菌离心管中, 加入无菌海水 10 mL, 超声波振荡 5 min 后漩涡振荡 5 min, 形成细菌悬浮液, 以平板稀释法进行 10 倍稀释, 取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释液各 0.1 mL 涂布于 CMC-Na 固体平板中, 30 °C 倒置培养 48 h。根据菌落形态、颜色等分离纯化单菌落。

1.2.2 水体游离菌: 量取 1 mL 水样进行 10 倍稀释, 各取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释液 0.1 mL 涂布于 CMC-Na 固体平板中, 30 °C 倒置培养 48 h。根据菌落形态、颜色等分离纯化单菌落。

1.3 纤维素降解菌初筛

将分离得到的纤维素降解菌点样接种到 CMC-Na 平板培养基上, 30 °C 倒置培养 48 h 后, 用 1% 的刚果红溶液染色 1 h, 再用蒸馏水清洗, 最后用 1 mol/L NaCl 溶液脱色 1 h, 能产生透明水解圈的菌株即是能产纤维素酶菌株。记录水解圈直径 D 及菌体直径 d , 以两者比值的平方 $D_p = (D/d)^2$ 的大小作初筛的标准, D_p 值越大表明菌对纤维素降解能力越强^[13]。

1.4 纤维素降解菌复筛

以常规纤维素酶活: 全酶活(FPA 酶活)、甘蔗渣纤维素酶活、内切葡聚糖酶活(CMCase 酶活)、 β -葡萄糖苷酶活大小作为指标对初筛中得到的菌株进行复筛。酶活力定义为: 1 mL 酶液每分钟催化底物产生 1 μg 葡萄糖为 1 个酶活单位, 以 U/mL 表示。

1.4.1 粗酶液的制备: 将初筛得到的菌株接种到

CMC-Na 液体培养基中, 制成液体菌种。按体积分数 1% 将液体菌种接种至含有 100 mL 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 30 °C、150 r/min 培养 48 h。取菌液在 $10\,000 \times g$ 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。

1.4.2 FPA 酶活测定^[14]: 将 6 cm \times 1 cm 的 Whatman No.1 滤纸放入 20 mL 的具塞刻度管中, 加入 1.5 mL 磷酸缓冲液(pH 6.8), 50 °C 水浴预热 5 min 后加入 0.5 mL 粗酶液, 在 50 °C 水浴中反应 1 h 后以 DNS 法测定还原糖量。

1.4.3 甘蔗渣纤维素酶活测定^[15]: 称取 0.1 g 碱处理过的甘蔗渣粉于 20 mL 的具塞刻度管中并加入 1.5 mL 磷酸缓冲液(pH 6.8), 再加入 0.5 mL 粗酶液, 在 50 °C 水浴中反应 1 h。还原糖测定方法同 1.4.2。

1.4.4 CMCase 酶活测定^[6]: 在 20 mL 具塞刻度管中分别加入 1.5 mL 由磷酸缓冲液(pH 6.8)配制的 1% CMC-Na 溶液及 0.5 mL 粗酶液, 在 50 °C 水浴中反应 1 h。还原糖测定方法同 1.4.2。

1.4.5 β -葡萄糖苷酶活测定^[16]: 在 20 mL 具塞刻度管中分别加入 1.5 mL 由磷酸缓冲液(pH 6.8)配制的 0.5% 水杨苷溶液及 0.5 mL 粗酶液, 在 50 °C 水浴中反应 1 h。还原糖测定方法同 1.4.2。

1.5 混合发酵对纤维素降解菌酶活力影响的研究

选取复筛中具有较高酶活力的菌株, 测定不同纤维素降解菌株间的混合酶液酶活及混合发酵酶液酶活, 以研究纤维素降解菌间不同处理对其纤维素酶活力的影响; 同时将纤维素降解菌与芽孢杆菌 BZ5 混合发酵, 测定发酵物酶活力, 以研究混合发酵中非纤维素降解菌对纤维素降解菌酶活力的影响。同时以反映纤维素降解菌综合降解能力的全酶活(FPA 酶活)及反映天然纤维素降解能力的甘蔗渣纤维素酶活作为指标, 评价菌株间不同处理方式对纤维素降解能力的影响。

1.5.1 混合酶液酶活测定: 将不同纤维素降解菌的粗酶液按体积比 1:1 混合, 测定混合酶液 FPA 酶活、甘蔗渣纤维素酶活, 并比较其与各菌株单独培养时

酶活力差异。

1.5.2 混合发酵酶活测定: 将不同纤维素降解菌及纤维素降解菌与芽孢杆菌 BZ5 的液体菌种按体积比 1:1 接种,混合培养 48 h 后制备混合发酵粗酶液,测定其 FPA 酶活、甘蔗渣纤维素酶活,并比较其与各菌株单独培养时酶活力差异。研究不同纤维素分解菌间及纤维素分解菌与芽孢杆菌 BZ5 之间混合发酵对菌株纤维素降解能力的影响。

1.6 菌种鉴定

菌株 16S rRNA 基因序列分析鉴定: 菌株 16S rRNA 基因提取按照细菌基因组提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]的方法。PCR 扩增菌株 16S rRNA 基因引物为通用引物 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTAC CTTGTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50 μ L): 无菌 ddH₂O 31.5 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, 2 mmol/L dNTPs 5 μ L, MgCl₂ 3 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L, 模板 (200 mg/L) 3 μ L, 27F 和 1492R 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 56 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩

增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果在 NCBI 中用 BLAST 搜索同源序列,以软件 DNAMAN 6.0 分析菌种间同源性,用 ClustalX 软件进行多重序列比对,用 MEGA 6.0 软件构建 NJ 系统发育树,并进行 1 000 次 Bootstraps 检验^[17]。

2 结果与分析

2.1 纤维素降解菌的初筛结果

通过分离筛选得到共 19 株能够产生纤维素酶的菌株,其中有 6 株菌分离自蔗渣表面,编号为 Z1-Z6; 13 株菌分离自水体,编号为 S1-S13。各菌株在 CMC-Na 平板上水解情况如表 1 所示。

由表 1 可以看出菌株 Z2、S1 在羧甲基纤维素钠平板上菌落直径最大,说明其具有较快的生长速度; 菌株 Z4、Z6、S5 的 D_p 值较大,其具有较高的纤维素水解能力。综合考虑菌株生长特性与纤维素水解能力,选取甘蔗渣附着菌株 Z1、Z4、Z6 及水体游离菌株 S3、S5、S10 作为复筛菌株。

2.2 纤维素降解菌酶活测定结果

2.2.1 各菌株酶活测定结果: 由图 1 可知, 6 株菌

表 1 不同菌株在 CMC-Na 平板上水解情况
Table 1 CMC-Na hydrolytic ability of strains

菌株 Strains	菌落直径 Colony zone (mm)	透明圈直径 Distinct zone (mm)	D_p 值 D_p value	菌株 Strains	菌落直径 Colony zone (mm)	透明圈直径 Distinct zone (mm)	D_p 值 D_p value
Z1	4.53	9.07	4.01	S5	4.36	9.16	4.42
Z2	5.47	7.38	1.82	S6	3.94	7.82	3.95
Z3	3.14	4.62	2.16	S7	3.56	7.23	4.13
Z4	2.91	7.86	7.30	S8	3.97	6.37	2.58
Z5	4.55	7.20	2.51	S9	3.47	6.59	3.62
Z6	2.82	7.38	6.83	S10	3.40	7.68	5.11
S1	5.96	8.71	2.13	S11	3.93	7.05	3.22
S2	4.54	8.99	3.91	S12	4.15	7.97	3.69
S3	4.30	9.01	4.39	S13	4.35	7.72	3.15
S4	4.39	7.81	3.17				

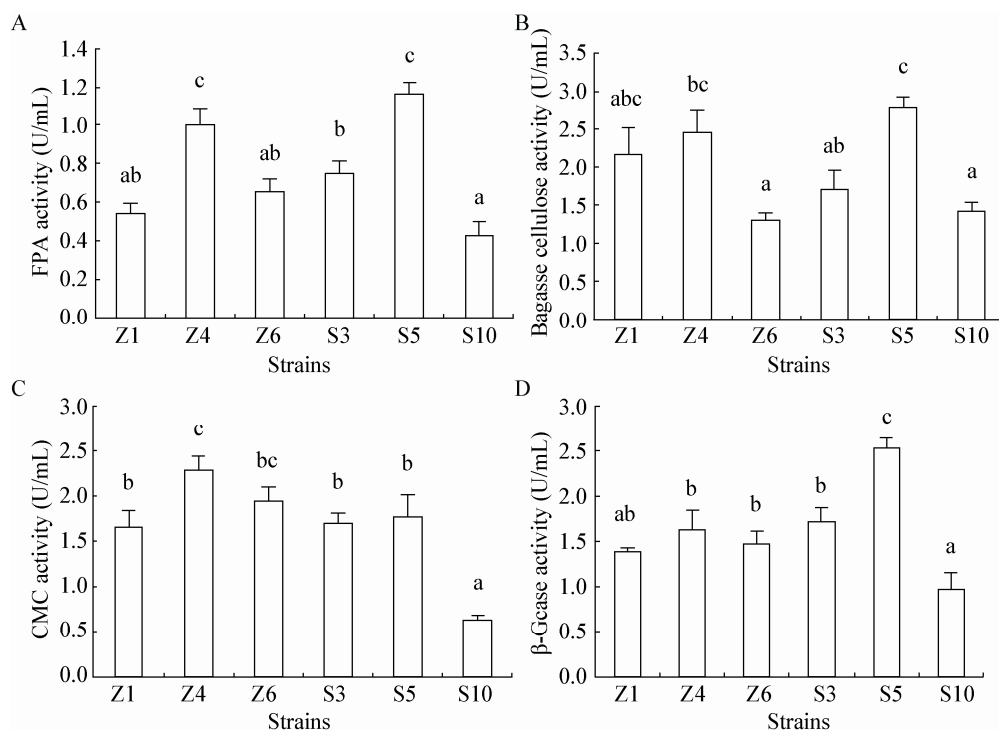


图1 各菌株全酶活(A)、甘蔗渣纤维素酶活(B)、内切葡聚糖酶活(C)、β-葡萄糖苷酶活(D)

Figure 1 Holoenzyme (A), bagasse cellulase (B), exocelase (C) and β-Glucosidase (D) activity of strains

注: 不同字母表示差异显著($P < 0.05$).

Note: The different letter indicates significantly different ($P < 0.05$).

均具有分解纤维素的不同组分酶, 而且其内切酶活(CMC 酶活)及 β-葡萄糖苷酶活均高于全酶活(FPA 酶活), 同时各菌株具有比全酶活更高的甘蔗渣纤维素酶活。除菌株 S10 外其余菌株均具有较高的内切酶活, 其中菌株 Z4 具有最高的内切酶活达到 2.28 U/mL。菌株 S5 具有最高的 β-葡萄糖苷酶活, 达到 2.52 U/mL, 显著高于其他菌株。菌株 Z4 与 S5 的全酶活显著高于其他菌株, 分别达到 1.01 U/mL 及 1.16 U/mL, 同时也具有最高的甘蔗渣纤维素酶活, 达到 2.45 U/mL 及 2.80 U/mL。全酶活表示菌株各组分酶对滤纸纤维素的综合降解能力, 甘蔗渣纤维素酶活则表示菌株对甘蔗渣纤维素的分解能力, 菌株的甘蔗渣纤维素酶活均高于全酶活可能是由于菌株分离自富含甘蔗渣纤维素的环境所致, 其纤维素酶体系对甘蔗渣纤维素具有更强的作用能力。结果表明, 菌株 Z4、S5 具有最高的

纤维素降解能力。

2.2.2 混合酶液酶活测定结果: 如图 2 所示, 将不同菌株的粗酶液等比例混合后并不能提高其酶活力, 反而会降低其酶活力。在全酶活测定中发现菌株 S3 和 Z4 的混合酶活力低于混合前的任一菌株酶活力, 而其它组合全酶活力则在两菌株各自酶活力之间。同时在甘蔗渣纤维素酶活测定中发现所有组合的混合酶活力均小于未混合前的单株菌酶活力。因此, 简单的混合不同菌株的粗酶液不能达到提高纤维素利用能力的目的。一方面可能是由于不同菌株的纤维素酶体系对纤维素作用具有特异性, 不同酶体系的简单混合并不能提高混合酶液的酶活力; 另一方面可能是由于菌株的胞外产物中存在影响其他菌株胞外产物活性的物质, 对其他菌株的纤维素酶有抑制作用, 从而降低了混合酶液酶活力。

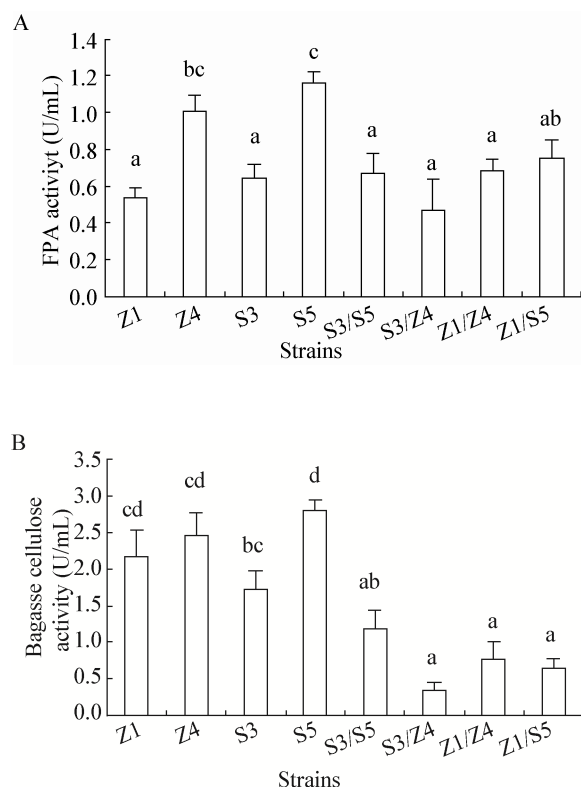


图 2 不同菌株粗酶液混合后全酶活(A)和甘蔗渣纤维素酶活(B)变化

Figure 2 Holoenzyme (A) and bagasse cellulose (B) activity of different mixed enzyme solutions

注: 不同字母表示差异显著($P<0.05$).

Note: The different letter indicates significantly different ($P<0.05$).

2.2.3 混合发酵酶活测定结果: 如图 3 所示, 选取纤维素降解能力较强的菌株 Z4、S5 及芽孢杆菌 BZ5 等比例混合发酵 48 h 酶活测定结果。菌株 Z4 和 S5 混合发酵后能明显提高全酶活及甘蔗渣纤维素酶活, 分别比 S5 单独发酵时酶活提高 40.60%、14.21%。同时菌株 S5 和 BZ5 的混合发酵也提高了 S5 的纤维素酶活力, 其全酶活及甘蔗渣纤维素酶活分别提高了 6.23% 及 25.92%。不同菌株的混合发酵酶活性高于单一菌株的原因可能是不同菌株在相同环境培养过程中形成互补性, 使酶体系中各组分酶比例更加协调, 从而提高了酶活力^[18]。然而菌株 Z4 和 BZ5 混合发酵却比 Z4 单独发酵时酶活要低, 这可能是由于菌株间存在拮抗作用, 因此不同菌株

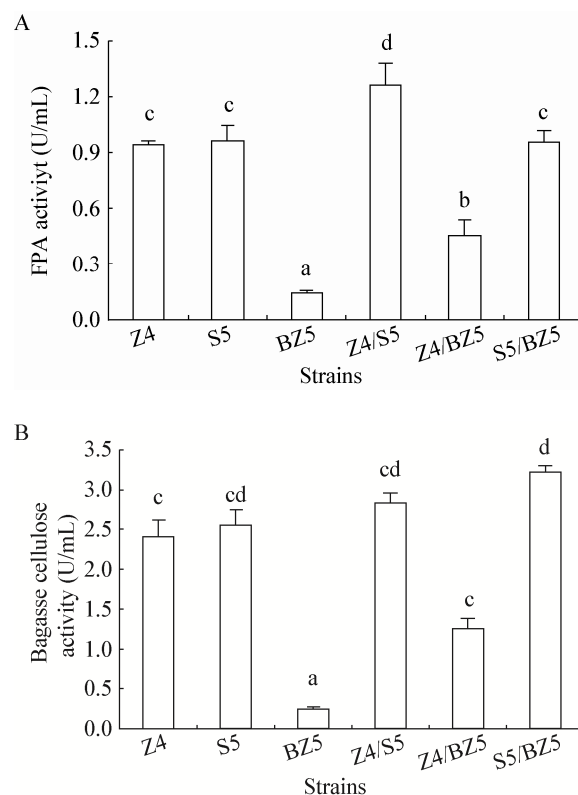


图 3 不同菌株等比例混合发酵后全酶活(A)和甘蔗渣纤维素酶活(B)变化

Figure 3 Holoenzyme (A) and bagasse cellulose (B) activity of mixed culture of strains

注: 不同字母表示差异显著($P<0.05$).

Note: The different letter indicates significantly different ($P<0.05$).

混合发酵对酶活的作用还需进一步研究。

2.2.4 16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析结果: 根据酶活测定结果选取具有最高全酶活的菌株 Z4 及 S5 的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 经纯化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 序列长度分别为 1 192 bp 和 1 177 bp。与 GenBank 已有基因序列对比发现两株菌均与地衣芽孢杆菌属 (*Bacillus licheniformis*) 菌株有 97% 相似性。将菌株 Z4 及 S5 基因序列上传至 GenBank, 登录号分别为 KM853150、KJ940964, 下载相似序列构建 NJ 系统进化树如图 4 所示, 与其他菌株相比处于不同的进化分支上, 而 Z4 与 S5 处于同一进化分支, 初步确定两菌株属于地衣芽孢杆菌属。

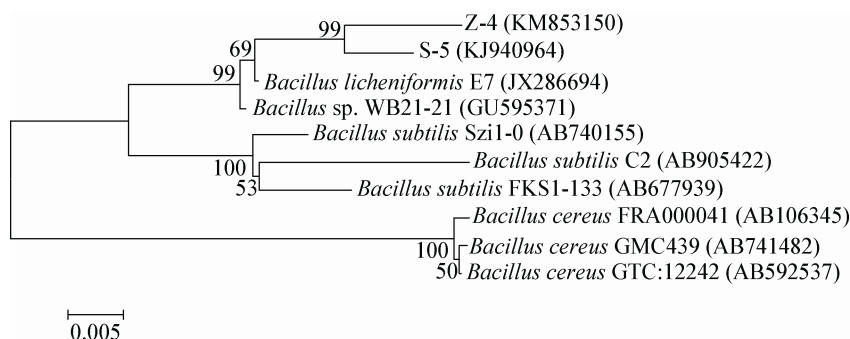


图4 菌株 Z-4、S-5 及在 GenBank 中与其相关种属以 16S rRNA 基因为基础构建的进化树

Figure 4 Phylogenetic analysis of Z-4 and S-5 based on the sequences of 16S rRNA gene

3 讨论

纤维素是世界上最丰富的可再生有机资源,是农作物秸秆的主要成分,由葡萄糖分子以 β -1,4-糖苷键链接而成^[19]。天然纤维素由于结构复杂,常规方法难以充分利用其蕴藏的巨大生物质能,国内外学者普遍通过物理化学等预处理方法并利用高效纤维素分解菌以快速高效分解利用纤维素。

在本研究中,利用刚果红染色法从富含甘蔗渣纤维素环境中初筛得到 19 株具有全酶系菌株,并选取其中透明圈较大、生长较快的 6 株菌进行酶活测定,进一步筛选得到两株高效纤维素降解菌株 Z4 和 S5,其全酶活分别为 1.01 U/mL 和 1.16 U/mL。本研究结果高于贺军军等^[20]筛选得到的甘蔗渣纤维素降解菌酶活,以及徐庆强等^[21]筛选得到的海洋产纤维素酶细菌酶活,然而低于许多已报道的其他陆源细菌菌株酶活,如王洪媛等^[13]从堆肥中筛选得到的菌株 W4,此菌株酶活可达到 21.27 U/mL,其差异可能是与菌株不同生境有关,并且在本研究中没有优化菌株培养条件也可能是使菌株酶活较低的原因。同时发现全酶活力高的菌株其甘蔗渣纤维素酶活也高,其中 S5 的甘蔗渣纤维素酶活达到 2.80 U/mL,大幅高于菌株的 FPA 活力及 CMC 酶活力,这与郝月等^[6]的研究结果相反。其原因一方面可能是本试验菌株筛选自富含甘蔗渣纤维素环境,高浓度的甘蔗渣纤维素底物可能诱导产生具高酶

活的菌株;另一方面可能是菌株纤维素酶体系有关,测定天然纤维素酶活时的底物与菌株实际利用底物相近,其酶体系与甘蔗渣纤维素具有了适应性。纤维素降解菌的纤维素分解能力与许多因素有关,如温度、pH、底物种类等,在筛选纤维素功能菌时,从与实际使用条件相近的环境中筛选得到纤维素降解菌更具有现实意义。

在自然界中,木质纤维素的降解往往是在多种微生物的共同作用下完成的,单一菌种对纤维素的降解能力往往不如多菌种的有机结合。Souichiro 等^[22]研究表明通过与非纤维素分解菌的混合培养能提高纤维素分解菌的纤维素降解能力。冯月等^[23]、涂璇等^[24]、冯玉杰等^[25]研究发现通过纤维素降解菌间的混合发酵也能提高纤维素降解菌的降解能力。利用不同菌株间的相互作用可以有效提高菌株对纤维素的利用能力,然而简单地将不同菌株的粗酶液等比例混合并不能达到增加其纤维素利用能力的目的,但是通过混合发酵可以有效的增加菌株发酵物的纤维素酶活。在本实验中,纤维素降解菌 Z4 与 S5 的等比例混合发酵能明显提高其全酶活及甘蔗渣纤维素酶活,两菌株的混合发酵粗酶液全酶活及甘蔗渣纤维素酶活分别为 1.26 U/mL 和 2.84 U/mL,比 S5 单独发酵时酶活分别提高 40.60% 和 14.21%。芽孢杆菌 BZ5 是一株高氨氮降解菌,为实验室筛选保存菌种。菌株 BZ5 与 S5 的等比例

混合发酵粗酶液的全酶活与甘蔗渣酶活达到 0.96 U/mL 和 3.22 U/mL, 分别比 S5 单独发酵时提高 6.23% 和 25.92%, 这可能是由于在发酵过程中 BZ5 能够利用纤维素代谢产物, 进而减少因纤维素分解产物的积累而对纤维素酶的反馈抑制调节, 从而提高了菌株 S5 的纤维素酶活力。而菌株 BZ5 与 Z4 的等比例混合发酵却降低了 Z4 的酶活力, 这可能是由于菌株间存在营养竞争作用使 Z4 在培养过程中生长繁殖受到限制, 从而减少了胞外酶的释放数量。因此, 在通过混合发酵提高纤维素降解能力时应对不同菌株间的协同关系作深入的研究, 并通过优化菌种接种比例、发酵条件等提高混合菌株发酵物的产酶量及酶活力, 从而提高纤维素利用能力。

微生物在养殖水环境中具有重要作用, 它们能通过氧化、氨化、硝化、反硝化等作用分解利用水体多余有机物。益生菌能够改良水质并可以作为抗生素的替代品防治疾病, 此外, 还能作为饲料添加剂及肥料为养殖系统中动植物提供营养元素, 从而促进养殖生物的生长, 改善养殖生物品质^[26]。在水产养殖中广泛使用的益生菌添加技术即是通过向养殖系统中添加有益微生物, 达到改善养殖环境的效果, 芽孢杆菌、乳酸菌及光合细菌等作为有益菌在水产养殖中具有广泛的应用, 并在营养、免疫、生态环境等方面有积极作用^[27]。本实验中筛选得到的两株纤维素降解菌属于地衣芽孢杆菌属, 筛选自盐度为 22–32 的海水对虾养殖系统, 适应海水养殖环境中独特的盐度、温度、pH、营养盐等特点, 具有与其他益生菌搭配使用的应用前景。向养殖系统中添加的甘蔗渣不但可以在纤维素分解菌的作用下持续提供碳源, 并且可以增加水体中附着基数量以促进细菌的定殖与生长^[28], 此外, 甘蔗渣在对虾养殖系统中可以作为底质促进氮循环菌的生长繁殖^[8], 从而形成有利于细菌生长的环境, 通过提高水体中细菌的数量水平达到提升养殖效果的目的。因此, 纤维素降解菌 Z4、S5 与甘蔗渣及芽孢杆菌等的配合使用在海水养殖中具有广阔的应用空间。

4 结论

本文以筛选适应海水环境纤维素降解菌为目的, 得到两株高效甘蔗渣纤维素降解菌, 通过 16S rRNA 基因测序和系统发育分析初步鉴定为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*); 纤维素降解菌与非纤维素降解菌的混合发酵及纤维素降解菌之间的混合发酵均能有效增加菌株的纤维素降解能力; 产纤维素降解菌与甘蔗渣的配合使用在海水养殖中具有广阔的应用前景。

致谢: 对中国海洋大学水产学院武志燕同学为本研究提供的帮助, 谨致谢忱。

参考文献

- [1] De Groot SJ. Hydrology and water supply for pond aquaculture[J]. *Aquaculture*, 1995, 133(2): 171-172
- [2] Akinbowale OL, Peng H, Barton MD. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(5): 1103-1113
- [3] Samocha TM, Patnaik S, Speed M, et al. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquacultural Engineering*, 2007, 36(2): 184-191
- [4] Hargreaves JA. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture[J]. *Aquacultural Engineering*, 2006, 34(3): 344-363
- [5] Van Dam AA, Beveridge M, Azim ME. The potential of fish production based on periphyton[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2002, 12(1): 1-31
- [6] Hao Y, Yang XH, Zhang J. Isolation and screening on straw cellulose-decomposing microorganisms[J]. *Chinese Agriculture Science Bulletin*, 2005, 21(7): 58-60 (in Chinese)
郝月, 杨翔华, 张晶, 等. 秸秆纤维素分解菌的分离筛选[J]. *中国农学通报*, 2005, 21(7): 58-60
- [7] Qu JG, Yao XM, Zhu P, et al. Screening and identification of a cellulose-producing marine bacterium and optimization of its fermentation conditions[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012(6): 1053-1057 (in Chinese)
曲均革, 姚晓敏, 朱鹏, 等. 产纤维素酶海洋细菌的筛选鉴定和产酶条件优化[J]. *上海海洋大学学报*, 2012(6): 1053-1057
- [8] Shan HW, Gao L, Ma S. Effect of bagasse used as bottom substrates on shrimp growth and environment in *Litopenaeus vannamei* intensive culture[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2013, 43(8): 37-43 (in Chinese)
单洪伟, 高磊, 马胜. 甘蔗渣作为底质对凡纳滨对虾生长和养殖环境的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2013, 43(8): 37-43
- [9] Xiong BL, Cui YL, Zhang JZ, et al. Investigation of the characteristics of adsorption of low-concentration Cd²⁺ and Cr³⁺ by modified sugarcane bagasse[J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2010, 32(1): 118-123 (in Chinese)
熊佰炼, 崔译霖, 张进忠, 等. 改性甘蔗渣吸附废水中低浓度 Cd²⁺ 和 Cr³⁺ 的研究[J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2010, 32(1): 118-123
- [10] Gao XC, Sheng JR, Zhao XH. Advances in the study of bagasse[J]. *Journal of Guangxi Teachers Education University*

- (Natural Science Edition), 2007, 24(4): 100-105 (in Chinese)
高星超, 盛家荣, 赵星华. 甘蔗渣的研究进展[J]. 广西师范学院学报: 自然科学版, 2007, 24(4): 100-105
- [11] Gao L. The effect and optimization of adjusting C/N ratio in the shrimp culture system[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012 (in Chinese)
高磊. 碳氮比调节在对虾养殖中的作用及优化[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2012
- [12] Gao L, Bao WY, Zhang TW. et al. Effect of water C:N ratio on the growth, antagonism and C:N ratio of bacillus, lactic acid bacteria and vibrio[J]. Periodical of Ocean University of China (Natural Science Edition), 2013, 43(1): 34-40 (in Chinese)
高磊, 包卫洋, 张天文, 等. 水体碳氮比对芽孢杆菌、乳酸菌与弧菌生长、拮抗作用及菌体碳氮比的影响[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2013, 43(1): 34-40
- [13] Wang HY, Fan BQ. Screening of three straw-cellulose degrading microorganism[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(7): 870-875 (in Chinese)
王洪媛, 范丙全. 三株高效秸秆纤维素降解真菌的筛选及其降解效果[J]. 微生物学报, 2010, 50(7): 870-875
- [14] Liu J, Li XZ, Gao PJ. Review of methods for determination of cellulase activity[J]. Industrial Microbiology, 1994, 24(4): 27-32 (in Chinese)
刘洁, 李宪臻, 高培基. 纤维素酶活力测定方法评述[J]. 工业微生物, 1994, 24(4): 27-32
- [15] Li RQ, Xin XY, Liu JQ, et al. Isolation and screening on straw cellulose-decomposing microorganisms[J]. Shanghai Environmental Sciences, 2002, 21(1): 8-11, 63 (in Chinese)
李日强, 辛小芸, 刘继青, 等. 天然秸秆纤维素分解菌的分离选育[J]. 上海环境科学, 2002, 21(1): 8-11, 63
- [16] Li H, Gao L. Research advance on methods of determining β -glucosidase activity[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2007, 26(2): 107-114 (in Chinese)
李华, 高丽. β -葡萄糖苷酶活性测定方法的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(2): 107-114
- [17] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729
- [18] Adsul MG, Bastawde KB, Varma AJ, et al. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production[J]. Bioresource Technology, 2006, 98(7): 1467-1473
- [19] Wang YP, Li JH, Liu YH, et al. Comprehensive utilization of bagasse: state of the art[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(16): 370-375 (in Chinese)
王允圃, 李积华, 刘玉环, 等. 甘蔗渣综合利用技术的最新进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(16): 370-375
- [20] He JJ, Luo P, Chen YH. et al. Screening and identification of cellulose degrading-bacteria from fermented bagasse[J]. Journal of Microbiology, 2011, 31(1): 39-42 (in Chinese)
贺军军, 罗萍, 陈永辉, 等. 甘蔗渣纤维素降解菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(1): 39-42
- [21] Xu QQ, Zhang ZM, Wang YM. et al. Screening, identification and properties study of marine bacteria producing alkaline cellulase[J]. Marine Sciences, 2009, 33(7): 1-5 (in Chinese)
徐庆强, 张志明, 王延明, 等. 产碱性纤维素酶海洋细菌的筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. 海洋科学, 2009, 33(7): 1-5
- [22] Souichiro K, Shin H, Zong J, et al. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 51(1): 133-142
- [23] Feng Y, Jiang JX, Zhu LW. et al. Cellulase activity and synergism of mixed cellulases[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2009, 31(S1): 169-173 (in Chinese)
冯月, 蒋建新, 朱莉伟, 等. 纤维素酶活力及混合纤维素酶协同作用的研究[J]. 北京林业大学学报, 2009, 31(S1): 169-173
- [24] Tu X, Xue QH, Si MR. et al. Effects of mixed poly-fermentation on cellulase activity[J]. Industrial Microbiology, 2004, 34(1): 30-34 (in Chinese)
涂璇, 薛泉宏, 司美茹, 等. 多元混菌发酵对纤维素酶活性的影响[J]. 工业微生物, 2004, 34(1): 30-34
- [25] Feng YJ, Li DM, Ren NQ. Study on saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol using mixed microbial species[J]. Acta Energiæ Solaris Sinica, 2007, 28(4): 375-379 (in Chinese)
冯玉杰, 李冬梅, 任南琪. 混合菌群用于纤维素糖化和燃料酒精发酵的试验研究[J]. 太阳能学报, 2007, 28(4): 375-379
- [26] Liu WZ. Application and research advances of microorganisms in aquaculture[J]. Fisheries Science, 2010, 29(1): 57-62 (in Chinese)
刘文珍. 水产养殖中微生物的应用及研究进展[J]. 水产科学, 2010, 29(1): 57-62
- [27] Chen YQ, Lin L, Yang YY. et al. Application of microbial preparation in aquaculture[J]. Ecologic Science, 2005, 24(1): 80-83, 89 (in Chinese)
陈永青, 林亮, 杨莺莺, 等. 微生物制剂在水产养殖中的应用[J]. 生态科学, 2005, 24(1): 80-83, 89
- [28] Arnold SJ, Cornan FE, Jackson CJ, et al. High-intensity, zero water-exchange production of juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*: an evaluation of artificial substrates and stocking density[J]. Aquaculture, 2009, 293(1/2): 42-48